

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Masahide SATO, et al

SERIAL NUMBER: NEW U.S. PCT APPLICATION (based on PCT/JP00/04355)

FILED: HEREWITH

FOR: METHOD OF MAKING FERMENTATION PRODUCT

REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT


Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Attorney of Record
Registration No. 34,423



22850

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

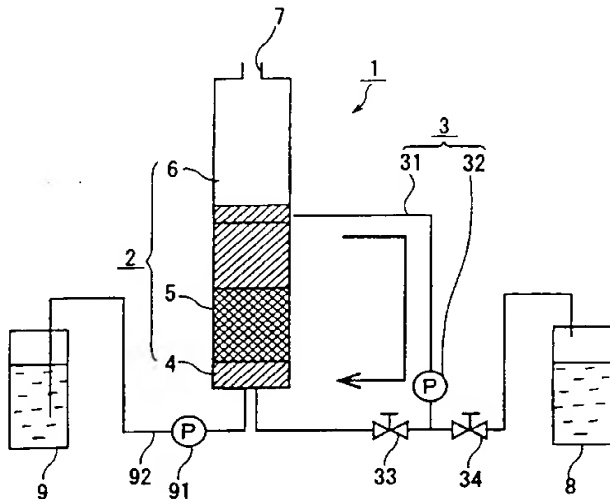
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02534 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12C 11/02 Masahide) [JP/JP]. 梅本進午 (UMEMOTO, Shingo) [JP/JP]; 〒425-0013 静岡県焼津市岡当目10番地 サッポロビール株式会社 醸造技術研究所内 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04355
- (22) 国際出願日: 2000年6月30日 (30.06.2000) (74) 代理人: 弁理士 長谷川芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ: 特願平11/186117 1999年6月30日 (30.06.1999) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サッポロビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LIMITED) [JP/JP]; 〒150-8686 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤雅英 (SATO, 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING FERMENTATION PRODUCT

(54) 発明の名称: 発酵生産物の製造法



(57) Abstract: A process for producing a fermentation product by effecting fermentation with the use of a bioreactor having an immobilized microorganism located therein, characterized in that a non-flocculent yeast is employed as the microorganism.

(57) 要約:

固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする発酵生産物の製造法。



明細書

発酵生産物の製造法

5 技術分野

本発明は、発酵生産物の製造法に関し、より詳しくは、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法に関する。

10 背景技術

バイオテクノロジーの発展により、麦芽アルコール飲料（ビール類）、ワイン、清酒、酢、醤油等の醸造分野において固定化微生物を利用したバイオリアクターによる発酵生産物の製造が検討されており、このようにバイオリアクターを用いることによって、

- 15 1) 高濃度の酵母を固定化して発酵を行なうため醸造が速く終了し、醸造期間の短縮が可能となり、それに伴って製造タンクの本数及び建設費の低減が可能となる、
- 2) 連続発酵が可能となるため酵母の投入・回収が不要となる、
- といったことが期待されている。

- 20 しかしながら、バイオリアクターを用いてビール等を製造した場合、従来は、伝統的な回分式の発酵法で製造した製品に比べて製品中のアミノ酸やジアセチル（DA）の量が多く、エステルの量が少なくなり、結果としてバイオリアクターを用いて得た製品は香味上の欠点があるという問題があり、バイオリアクターを主発酵に用いた場合に特に顕著であった。

- 25 そのため、このような問題の解決を図るべく従来から研究がなされており、特開平 7-123969 号公報には流動層型リアクターを用いた連続発酵法におい

て発酵液を循環させる方法が開示されている。しかしながら、この方法によっても発酵過程におけるアミノ酸の消費は改善されるものの、若臭・未熟臭の原因となるジアセチルの量の低減は十分ではなく、得られる製品は未だ香味上改良の余地を有するものであった。また、この方法を含むバイオリアクターでの製造方法

5 に関しては、主発酵終了時における浮遊酵母数が一般的に低く、また発酵過程における発酵速度が不安定となり、それらの制御が困難であるという課題も有していた。

ところで、ビール等の発酵生産物を製造するための酵母としては、従来からある程度の凝集性を有することが必要であると認識されていた。すなわち、凝集性

10 とは発酵終了時に酵母が集まって塊となって液から分かれて浮上又は沈降する性質をいい、凝集性が高すぎると早い時期に凝集が起こり、発酵液と酵母の接触が断たれて発酵不十分となり、他方、凝集性が低すぎるといつまでも酵母が液中に浮遊しているため酵母の回収量が低減し、遠心分離等による酵母の分離、回収が必要となる等の無駄な手間と時間がかかる。そのため、従来は、発酵生産物の製

15 造にはある程度の凝集性を有する酵母（凝集性酵母）を使用することが常識とされており、前述の特開平7-123969号公報に記載の方法においてもこのような凝集性酵母が使用されていた。

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、固定化微生物を利用したバイオリアクターによって発酵生産物を製造するにあたって、発

20 酵過程における発酵速度を一定に保つと共に、発酵終了時における浮遊酵母数を従来のものよりも高い水準に安定して維持することができ、これにより特に麦芽アルコール飲料をバイオリアクターによって製造する場合には、発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量を十分に低減する等して、最終製品の香味を改善することが可能な方法を提供することを目的とする。

25 発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、固定化微生物を利用したバイオリアクターを用いる場合においては、酵母を分離・回収する必要がないことから従来の認識に反して非凝集性の酵母を用いることができ、それによって発酵過程における発酵速度が一定となり、発酵終了時における浮遊酵母数が後発酵にとってより好ましい水準に安定して維持されるようになり、特に麦芽アルコール飲料の主発酵にかかるバイオリアクターを用いる場合においては発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量が十分に低減される等して製品の香味が向上するということを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の発酵生産物の製造法は、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする方法である。

また、本発明の麦芽アルコール飲料は、前記本発明の方法により製造されたものであることを特徴とするものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明に好適な流動層型リアクターの一例の概略模式図である。

図 2 は、継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

図 3 は、継続発酵回数とエキス消費量との関係を示すグラフである。

図 4 は、継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

図 5 は、継続発酵回数とジアセチル量との関係を示すグラフである。

図 6 は、継続発酵回数とエキス消費量との関係を示すグラフである。

図 7 は、継続発酵回数と浮遊酵母数との関係を示すグラフである。

図 8 は、継続発酵回数とジアセチル量との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

本発明は、固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法であり、前記微生物として非凝集性酵母を用いる。

5 5 先ず、本発明にかかる酵母及びその固定化担体について説明する。本発明において使用される酵母は、後述するように非凝集性である酵母であればよく、対象とする発酵生産物に応じた酵母の中から非凝集性のものが選択される。例えば、酒類の製造に用いる酵母としては、醸造原料液を代謝してアルコールや炭酸ガス等を産生するいわゆる酒類酵母の中から非凝集性のものが選択され、具体的には

10 10 サッカロミセス・セレビスエ、サッカロミセス・ウバルム等の中から非凝集性のものが選択される。このような非凝集性の酒類酵母としては非凝集性ビール酵母、非凝集性ワイン酵母、非凝集性清酒酵母等が挙げられ、例えば非凝集性ビール酵母を用いてビール類といった麦芽アルコール飲料を製造することができる。

ここで、凝集性とは、発酵過程において分散していた酵母が集合して細胞表面で付着・結合して塊（フロック）を形成する性質をいう。通常のビール製造に用

15 15 いられる下面発酵酵母では、発酵液中で細胞が凝集して塊を形成して液中から速やかに分離し易い特性を持った株と、凝集しにくく比較的長い期間分散・浮遊する特性を持った株とがあり、前者を「凝集性酵母」、後者を「非凝集性酵母（塵状酵母ともいう）」という。

このような酵母の凝集性は、本質的には酵母自身の持つ遺伝的特性で、サッカ

20 20 ロミセス・セレビスエの第VIII染色体に相当する位置に存在するLg-FLO1遺伝子によって制御されるということが報告されているが（特開平8-266287号公報）、醸造用水、原料、麦汁組成、麦汁通気条件、酵母の培養条件、発酵容器、酵母の取り扱い等によっても影響されたり、発酵経過の時期によって凝集性の強さが変化していくこともある。このように酵母株によっても凝集性には強弱が

25 25 あり、同じ種類の酵母でも株の差によって非凝集性のものと凝集性のものとがあるため、本発明においては下記の方法等によって非凝集性の株を選択し、その株

に由来した非凝集性酵母を使用することが好ましく、かかる非凝集性酵母のみを使用することが特に好ましい。

このように酵母の凝集性を測定して本発明の方法に使用する非凝集性酵母を選択する方法としては、YEAST GENETICS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS, 20
5 5-224 (1983)に記載の方法等があり、具体的には以下の方法が好ましい。

すなわち、酵母（発酵終了時に $3000 \times g$ 、10分間の遠心分離により沈澱分離された酵母）0.6gを20mlの水道水に添加して得られる酵母懸濁液に、この酵母懸濁液9mlに対して1mlの1500ppmのカルシウムイオンを含むpH4.5の0.5M酢酸緩衝液を加え、手で上下に振とうする等して全体を均一に攪拌して室温にて5分間静置する。
10

そして、凝集の程度を目視（肉眼）にて観察し、以下の基準：

0：非凝集性（肉眼にて液と塊の境界が確認されず、酵母の凝集・沈降が認められない）

1：弱い凝集性（肉眼にて液と塊の境界は確認できないが、一部の酵母の凝集・沈降が認められる）
15

2：並みの凝集性（肉眼にて液と塊の境界が確認でき、酵母の凝集・沈降が認められる）

3：強い凝集性（殆ど完全に酵母が凝集・沈降し、上清も殆ど完全に清澄となる）

にしたがって4段階に判定する。本発明においては、上記判定基準における非凝集性（レベル0）の条件を満たす非凝集性の株を選択し、その株に由来した非凝集性酵母を使用することが好ましく、かかる非凝集性酵母のみを使用することが特に好ましい。
20

このように本発明の方法においては従来の認識に反して非凝集性株に由来した非凝集性酵母を使用することにより、発酵過程において酵母がバイオリアクター容器内に凝集して沈降・堆積することが十分に防止され、それによって発酵速度
25

が一定に保たれると共に、主発酵終了時における浮遊酵母数が従来の凝集性酵母を用いる場合に比べて高い水準に安定して維持される。また、特に麦芽アルコール飲料の主発酵に本発明の方法を採用する場合においては、主発酵終了時の浮遊酵母数向上により主発酵終了時の発酵液中のジアセチル量が十分に低減され、更には後発酵でジアセチルが一層効率よく還元されて最終製品中のジアセチル量が十分に低減され、かかる未熟臭成分の減少によって製品の香味が向上する。

上記非凝集性酵母を固定化する担体としては、特に制限されず各種のものが使用できるが、特にキチン・キトサン、アルギン酸、カラギーナンからなる担体が好ましく、とりわけキトサン系ビーズ（キトサンのアセチル化により得られるキチン・キトサンを原料とする担体）が好ましい。キトサン系ビーズは親水性で多孔質であるため炭酸ガスの排出が容易となり、その上摩耗しにくく、密度が原料液に近いために流動性も良好となる。更に、キトサン系ビーズは保持できる微生物量が多いため、キトサン系ビーズによれば発酵時間をより短縮できる傾向にあり、しかも微生物が比較的緩やかに吸着固定化されるため増殖や離脱が容易となり、包括担体のように死菌体が担体内に存在し続けることも回避される。

このような担体に非凝集性酵母を固定化するに先だって行われる殺菌の方法は任意であり、高压滅菌法、苛性ソーダによる殺菌法、蒸気による殺菌法等が好ましい。また、担体に非凝集性酵母を固定化する方法も特に制限されず、例えば酵母懸濁液に担体を加えて攪拌あるいは液を循環させる方法が挙げられるが、その他の公知の方法であってもよい。

次に、本発明にかかるバイオリアクターについて説明する。本発明にかかるバイオリアクターは内部に前記固定化微生物（担体に固定化された非凝集性酵母）が配置され、その内部で原料液と固定化微生物とが接触して発酵が行なわれるものである。このようなバイオリアクターとしては、その形式から完全混合槽型リアクター、充填層型リアクター、膜型リアクター、流動層型リアクター、横形リアクター等が挙げられるが、麦芽アルコール飲料の主発酵のように醸造用原料の

代謝によってアルコールと炭酸ガスが生成される発酵にはガスを系外に排出するのが容易な流動層型リアクターが好ましい。

このような流動層型リアクターとしては、固定化微生物が内部に配置された流動層部と、流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して流動層部の上流側に
5 戻す液循環部とを備えたものが好ましく、図1に本発明に好適な流動層型リアクターの一例の概略模式図を示す。

図1に示す流動層型リアクター1は、反応タンク2及び液循環部3を備えており、反応タンク2はその上流側から順に整流部4、流動層部5、空筒部6により構成されており、反応タンク2の下流側端部にはガス排出部7が設けられている
10 。そして、液循環部3は流動層部5の下流側及び流動層部5の上流側（図1では整流部4）に接続された配管31とポンプ32及びバルブ33とから構成されており、更に配管31は途中で分岐してバルブ34を介して生産物タンク8に接続されている。また、反応タンク2の上流側端部には、原料液タンク9がポンプ91を有する配管92によって接続されている。

流動層部5は、微生物を固定化した担体を内部に配置してある部分であり、液
15 循環部3は、反応タンク2に供給された発酵液（原料液）の一部を流動層部5の下流側から抜き出して再び反応タンク2の流動層部5の上流側に戻す部分である。図1に示すリアクター1においては、抜き出された発酵液（原料液）は整流部4から反応タンク2内に戻され、導入された液の流れがここで整えられる。また
20 、空筒部6は、発酵中に生じる炭酸ガスと発酵液とを気液分離する部分であり、具体的には液面から反応タンク2上部のガス排出部7までの部分である。そして、空筒部6で分離された炭酸ガス等の気体はガス排出部7から容器外に排出される。

図1に示す流動層型リアクター1においては、微生物を固定化した担体を流動
25 層部5に配置し、原料液を原料液タンク9からポンプ91を用いて整流部4に供給して発酵を行なう。そして、発酵液（原料液）の一部を液循環部3のポンプ3

2を用いて流動層部5の下流側から抜き出し、再び反応タンク2の流動層部5の上流側（図1では整流部4）に戻して循環させることにより流動層を形成させつつ発酵させる。発酵中に生成した炭酸ガスは、発酵液を循環させていること等によって流動層内に滞留することなく、空筒部6を経てガス排気部7より容器外に排出される。なお、発酵中の液空塔速度（流動層単位体積あたりの流体の線速度）は、微生物を固定化した担体の密度によって変動させることができるが、1～20cm/minが好ましく、1～12cm/minがより好ましい。

図1に示す流動層型リアクター1においては、発酵が終了した後、発酵生産物を含む発酵終了液をリアクター1からポンプ32及びバルブ34を用いて生産物タンク8に取り出すと共に、リアクター1に原料液タンク9からポンプ91を用いて新たな原料液を供給して前記の発酵を反復実施することが好ましい。すなわち、発酵が終了した後、循環を停止して発酵終了液をリアクター1外に抜き出すと同時に、又はその直後に、リアクター1に新たな原料液を供給することによって、前記の発酵を反復して行なわせる。

なお、リアクター1の運転方法は、回分式、反復回分式、連続式のいずれも可能であるが、より良好な香味を有する製品を短時間で得るためには反復回分式の発酵が好適である。発酵中に微生物の増殖と更新が行なわれ、また菌体の生理状態や増殖周期及びリアクター1内の菌体分布等が伝統的な酒類の製造方法である回分式操作に類似しているため、反復回分式によれば香味がより良好になる傾向にある。

発酵生産物を製造するための原料としては、使用する非凝集性酵母による発酵に適したものであればよく、既知のものを任意に使用することができる。例えば、酒類の製造には、通常は麦汁、果汁、糖液、穀類糖化液等が単独で、もしくは適宜混合して用いられる。その他、必要に応じて適当な栄養分等を加えてもよい。

また、発酵条件については基本的には既知の条件と変わらず、例えば発酵温度

としては麦芽アルコール飲料醸造の場合は通常 15℃以下、好ましくは 8～10℃であり、ワイン醸造の場合は通常 20℃以下、好ましくは 15～20℃である。

本発明の方法で製造可能な発酵生産物としては、麦芽アルコール飲料、ワイン、清酒、酢、醤油等の様々な醸造分野における生産物が挙げられるが、麦芽アルコール飲料、ワイン、清酒等の酒類が好適であり、中でも本発明によれば香味が向上することからビール等の麦芽アルコール飲料がより好ましい。

[実施例]

以下、実施例及び比較例により本発明の内容をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例及び比較例では、実際に製造現場で用いたビール酵母（サッカロミセス・セレビシエ等）から前述の方法及び基準によって選別した凝集性株（A-1, A-2）及び非凝集性株（NA-1, NA-2, NA-3, NA-4, NA-5）を使用した。それらの凝集性を判定した結果を表 1 に示す。また、参考として、NCYC（National Collection of Yeast Cultures（英国））におけるタイプカルチャーNCYC-No.203及びNCYC-No.985についても同様に凝集性を判定した結果を表 1 に示す。

表 1

ビール酵母の凝集性判定結果		
	酵 母	判定結果
作業酵母	A-1	2
	A-2	2
	NA-1	0
	NA-2	0
	NA-3	0
	NA-4	0
	NA-5	0
タイプ カルチャー	NCYC-No.203	2
	NCYC-No.985	0

実施例 1～2 及び比較例 1

図 1 に示す流動層型バイオリアクター（全容積：180ml）を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式（反復回分式）で行った。そして、得られた発酵液について後述する浮遊酵母数試験を実施した。

5 [主発酵条件]

担体 : キトサン系ビーズ（富士紡績社製、キトパールHP）、

スケール：担体50ml、麦汁量100ml、

使用菌株：A-1（比較例1）、NA-1（実施例1）、NA-2（実施例2）、

10 酵母固定化法：常法に従い循環しながら2日間担体と接触させて固定化（担体50mlに対して泥状酵母2.4g）、

流速 : 約1ml/分、

発酵温度：8℃一定、

発酵時間：48時間/回、

継続発酵回数：10回（回分発酵）、

15 使用麦汁：糖度11%Platoに調整した麦汁。

（浮遊酵母数試験）

各回の主発酵終了後、発酵液中の浮遊酵母数をトーマの血球計算盤を用いて測定した。得られた結果を表2及び図2に示す。なお、繰り返し発酵の最初の数回は、担体中酵母の馴養期間に相当することから、測定の対象から外した（以下同様）。

20

表2及び図2に示した結果から明らかなように、この条件で非凝集性株を用いた場合は発酵終了時の浮遊酵母数が2～4千万cells/mlと通常の発酵の場合により近い高い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は発酵後半で酵母が担体上部に沈降する様子が観察され、発酵終了時の浮遊酵母数が7回目の発酵までは1千万cells/ml以下であった。

25

なお、10回の継続発酵終了後に担体中の酵母数を測定したところ、3株とも

10⁹ cells/担体1ml当り程度であり、非凝集性株においても凝集性株と同様に主発酵用バイオリアクターとしての実用に耐え得る固定化酵母数が達成されたことが確認された。また、担体に固定化されている酵母の様子を電子顕微鏡にて確認したところ、非凝集性株も凝集性株と同様にキトサン系ビーズ担体中に十分に固定化されていることが確認された。更に、10回の継続発酵終了後に担体内外の死細胞率を調べたところ、3株とも10%以下で問題はなかった。

表2

主発酵終了時の浮遊酵母数(単位: ×10 ⁶ cells/ml)								
発酵回数	1	2	3	4	5	6	7	平均値
NA-1	35	32	33	44	30	36	42	36.0
NA-2	26	32	32	34	14	25	22	26.4
A-1	5	7	9	5	8	7	11	7.4

実施例3～4及び比較例2

図1に示す流動層型バイオリアクター（全容積：20リットル）を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式（反復回分式）で行った。そして、得られた発酵液について後述する発酵性試験、浮遊酵母数試験、ジアセチル生成量試験を実施した。

〔主発酵条件〕

担体：キトサン系ビーズ（富士紡績社製、キトパールHP）、

スケール：担体6L、麦汁量 8L

使用菌株：A-2（比較例2）、NA-3（実施例3）、NA-4（実施例4）、

酵母固定化法：常法に従い循環しながら2日間担体と接触させて固定化（担体6Lに対して泥状酵母650g）、

液空塔速度：6～12 cm/min、

発酵温度：8℃一定、

発酵時間：48時間／回、

継続発酵回数：7回（三分発酵）、

使用麦汁：糖度11%Platoに調整した麦汁。

（発酵性試験）

各回の主発酵過程においては、発酵速度比較の指標として発酵開始24時間の
 5 エキス消費量を振動式密度計（アントンパール社製、DMA 58）により測定し
 た値を使用した。得られた結果を表3及び図3に示す。

表3及び図3に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は発
 酵速度は1回目以降でほぼ一定の値に収束した（約6.7%/24hr）。また、主発酵
 はほぼ2日間で終了した。なお、非凝集性株を用いた場合は、酵母がリアクター
 10 の中に堆積する様子は観察されなかった。

一方、凝集性株を用いた場合は凝集・沈降した酵母がリアクター容器内に堆積
 し、発酵に関与する酵母量が増加して発酵速度が速くなる傾向にあり、発酵速度
 は一定しなかった。なお、凝集性株を用いた場合における発酵3回目が2回目よ
 りも発酵速度が緩やかになっているが、これはその間に短時間の麦汁交換により
 15 堆積した酵母を取り除いたためである。このように凝集性株を使用した場合はそ
 の発酵速度の制御に難があり、発酵速度を安定化させるためには堆積酵母の除去
 といった処理を行なう必要があった。

表3

発酵開始24時間のエキス消費量(%)					
発酵回数	1	2	3	4	平均値
NA-3	6.4	7.0	7.2	6.8	6.8
NA-4	5.9	6.7	6.8	6.6	6.5
A-2*1	8.2	9.6	8.1	8.5	8.6

* 1: A-2は、2,3 回目の間で麦汁により
 25 カラム内を洗浄し、発酵速度を制御した。

(浮遊酵母数試験)

各回の主発酵終了後、発酵液中の浮遊酵母数を実施例 1 と同様の方法で測定した。得られた結果を表 4 及び図 4 に示す。

表 4 及び図 4 に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は発酵終了時の浮遊酵母数が NA-3 については 2.3~3.9 千万 cells/ml、NA-4 については 1.8~3.3 千万 cells/ml と高い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は 0.5~3.1 千万 cells/ml であり、反復回分発酵の後半で酵母がリアクター内に堆積し、その影響によって主発酵終了時の浮遊酵母数の変動が激しいことが認められた。

表 4

	主発酵終了時浮遊酵母数(10^6 cells/ml)				
発酵回数	1	2	3	4	平均値
NA-3	24	23	39	28	28.5
NA-4	29	33	30	18	27.5
A-2	5	12	25	31	18.3

(ジアセチル生成量試験)

各回の主発酵終了後、発酵液中のジアセチル (DA) の生成量をガスクロマトグラフィー (島津製作所社製、GC-14B) により測定した。得られた結果を表 5 及び図 5 に示す。

表 5 及び図 5 に示した結果から明らかなように、非凝集性株を用いた場合は主発酵終了時のジアセチル生成量が 0.3~0.6 ppm と低い水準に安定して維持された。一方、凝集性株を用いた場合は 0.4~1.3 ppm であり、ジアセチルの生成量は非凝集性株では凝集性株の半分程度でかつ低い水準に安定して維持されることが明らかになった。

表 5

	主発酵終了時DA生成量(ppm)							
発酵回数	1	2	3	4	5	6	7	平均値*2
NA-3	0.42	0.36	0.36	0.33	0.60	0.38	0.41	0.41
NA-4	0.55	0.49	0.39	0.42	0.37	0.44	0.42	0.44
A-2	0.53	0.42	0.98	0.49	1.27	0.90	0.78	0.77

* 2: 通常レベル: 約0.4ppm

実施例 5

図 1 に示す流動層型バイオリアクター（全容積：450リットル）を用い、以下の諸条件の下で主発酵工程を前述の繰り返し回分発酵形式（反復回分式）で行った。そして、得られた発酵液について前述と同様の方法により発酵性試験、浮遊酵母数試験、ジアセチル生成量試験を実施した。更に、本実施例では、最終製品の香味成分試験及び官能試験も実施した。

〔主発酵条件〕

担体：キトサン系ビーズ（富士紡績社製、キトパールHP）、

スケール：担体120L、麦汁量170L、

使用菌株：NA-5（非凝集性株）、

酵母固定化法：実施例 3、4 と同様に、常法に従い担体120Lに対して泥状酵母約13kgを循環しながら固定化した、

液空塔速度：6～12 cm/min、

発酵温度：8℃一定、

発酵時間：48時間／回、

継続発酵回数：9回（回分発酵）、

使用麦汁：糖度11%Platoに調整した麦汁。

〔後発酵条件〕

スケール：30L、

期間：4週間、

後発酵温度：8～0℃。

本実施例の発酵性試験においては、表 6 及び図 6 に示した結果から明らかなように、馴養期間終了後の発酵速度はほぼ一定の値（平均値約5.8%/24hr）となった。また、この場合も凝集性株の使用時に見られるバイオリクター内での酵母の堆積は観察されなかった。

表 6

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
エクス消費量 (%/24時間)	5.6	5.8	5.4	5.8	5.3	6.2	5.7	6.7	6.0	5.8

また、本実施例の浮遊酵母数試験においては、表 7 及び図 7 に示した結果から明らかなように、他の小スケールバイオリクターを用いた実施例の場合に比べてやや低い1千万～2千万cells/ml（平均値約1千5百万cells/ml）の水準であったが、80リットルスケールバイオリクターにおいて凝集性株を使用した場合の一般的水準（3百万～1千万cells/ml）に比べて高い水準に安定的に保持することができた。

表 7

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
浮遊酵母数 ($\times 10^6$ cells/ml)	14	17	17	21	13	10	11	11	18	14.6

更に、本実施例のジアセチル生成量試験においては、表 8 及び図 8 に示した結果から明らかなように、主発酵終了時のジアセチル生成量が0.5～0.7ppm（平均値約5.8ppm）であった。

表 8

発酵回数(回)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
DA含量 (ppm)	0.50	0.48	0.50	0.54	0.67	0.52	0.52	0.50	0.64	0.54

バイオリアクターでの主発酵を終了したビールは、引き続き30リットルスケールで4週間の後発酵を行ない、その後に最終製品ビールについて低沸点揮発成分(L.V.C.)、ジアセチルの分析及び官能検査を行なった。なお、低沸点揮発成分の分析は島津製作所社製ガスクロマトグラフィーGC4Aにより行なった。

表9に、9回目の主発酵により得られたビールを用いて得た最終製品ビールについての低沸点揮発成分及びジアセチルの分析結果を示す。表9に示した結果から明らかなように、本実施例で得られた最終製品ビールにおいては標準的なビールの分析値に比べて酢酸エステル量が高いのが特徴的であるが、バイオリアクター発酵で特に問題となるジアセチル量は0.02ppmと官能的にも殆ど感じられないレベルまで還元され低下していた。

また、本実施例で得られた最終製品ビールの試飲結果は、通常のビールと比較して大きな差異はなく、概ね良好であった。

表9

分析結果 (ppm)	アセト アルデヒド	アセトン	酢酸 エチル	n-PrOH	i-BuOH	酢酸 イソアミル	i-AmOH	DA
リアクター 発酵	4.3	0.1	36	14.6	12.7	2.0	56	0.02
ビール 標準値	1.4	0.6	20	9.2	7.1	1.5	50	0.01

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明の方法によれば、固定化微生物を利用したバイオリアクターによって発酵生産物を製造するにあたって、従来の認識に反して非凝集性の酵母を用いることにより、発酵過程における発酵速度を一定に保つと共に発酵終了時における浮遊酵母数をより高い水準に安定して維持することが可能となる。

そして、特に麦芽アルコール飲料をバイオリアクターによって製造する場合に本発明の方法を採用すれば、発酵液並びに最終製品中のジアセチルの量を十分に低減する等して製品の香味を向上させることが可能となる。

請求の範囲

1. 固定化微生物が内部に配置されたバイオリアクターを用いて発酵を行うことにより発酵生産物を製造する方法において、前記微生物として非凝集性酵母を用いることを特徴とする発酵生産物の製造法。

2. 前記非凝集性酵母として以下の条件 (a) を満たすものを用いることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

(a) 酵母 0.6g を 20ml の水道水に添加して得られる酵母懸濁液に、該酵母懸濁液 9ml に対して 1ml の 1500ppm のカルシウムイオンを含む pH4.5 の 0.5M 酢酸緩衝液を加え、全体を均一に攪拌して室温にて 5 分間静置した後に、肉眼にて酵母の凝集・沈降が認められないこと。

3. 前記バイオリアクターとして、固定化微生物が内部に配置された流動層部と、前記流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して該流動層部の上流側に戻す液循環部とを備えた流動層型リアクターを用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

4. 前記流動層部の下流側から発酵液の一部を抜き出して該流動層部の上流側に戻すことにより流動層を形成させつつ発酵を行い、得られた発酵生産物を前記リアクターから取り出すと共に該リアクターに新たな原料液を供給して前記発酵を反復実施することを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

5. 前記固定化微生物として、非凝集性酵母をキトサン系固定化用担体に固定化したものを用いることを特徴とする請求項 1～4 のうちのいずれか一項に記載の方法。

6. 前記非凝集性酵母が非凝集性酒類酵母であり、前記発酵生産物が酒類であることを特徴とする請求項 1～5 のうちのいずれか一項に記載の方法。

7. 前記非凝集性酵母が非凝集性ビール酵母であり、前記発酵生産物が麦芽アルコール飲料であることを特徴とする請求項 1～5 のうちのいずれか一項に記載

の方法。

8. 請求項 1 ～ 7 のうちのいずれか一項に記載の方法により製造されたものであることを特徴とする麦芽アルコール飲料。

図 1

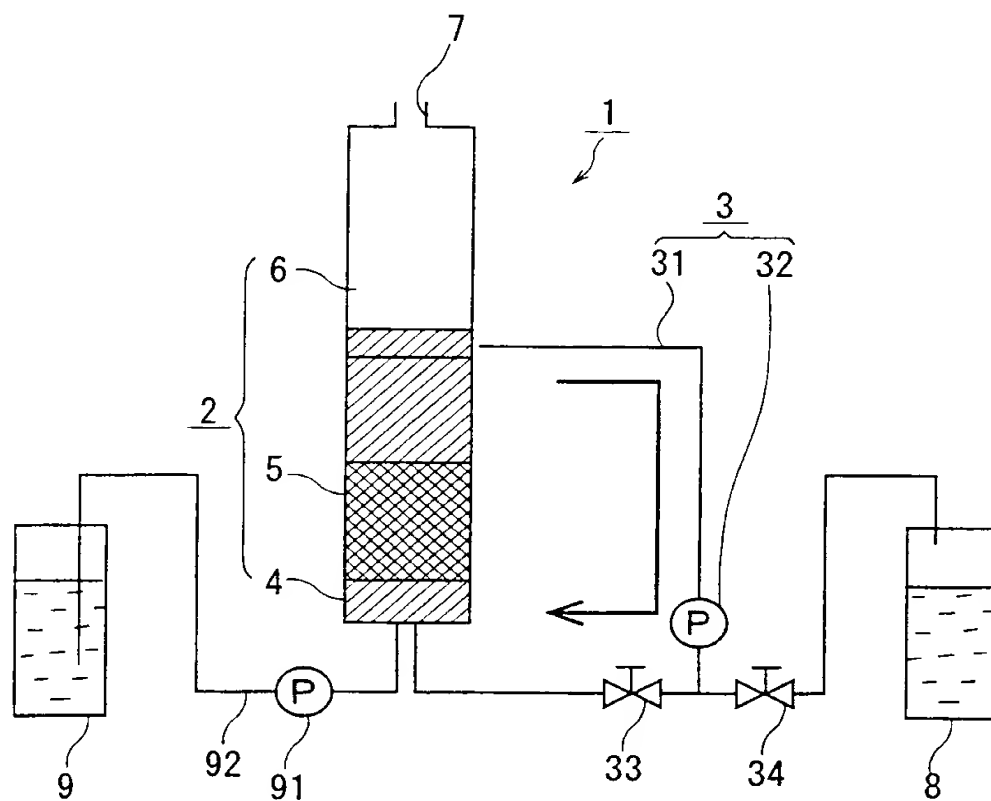


図2

主発酵終了時の浮遊酵母数

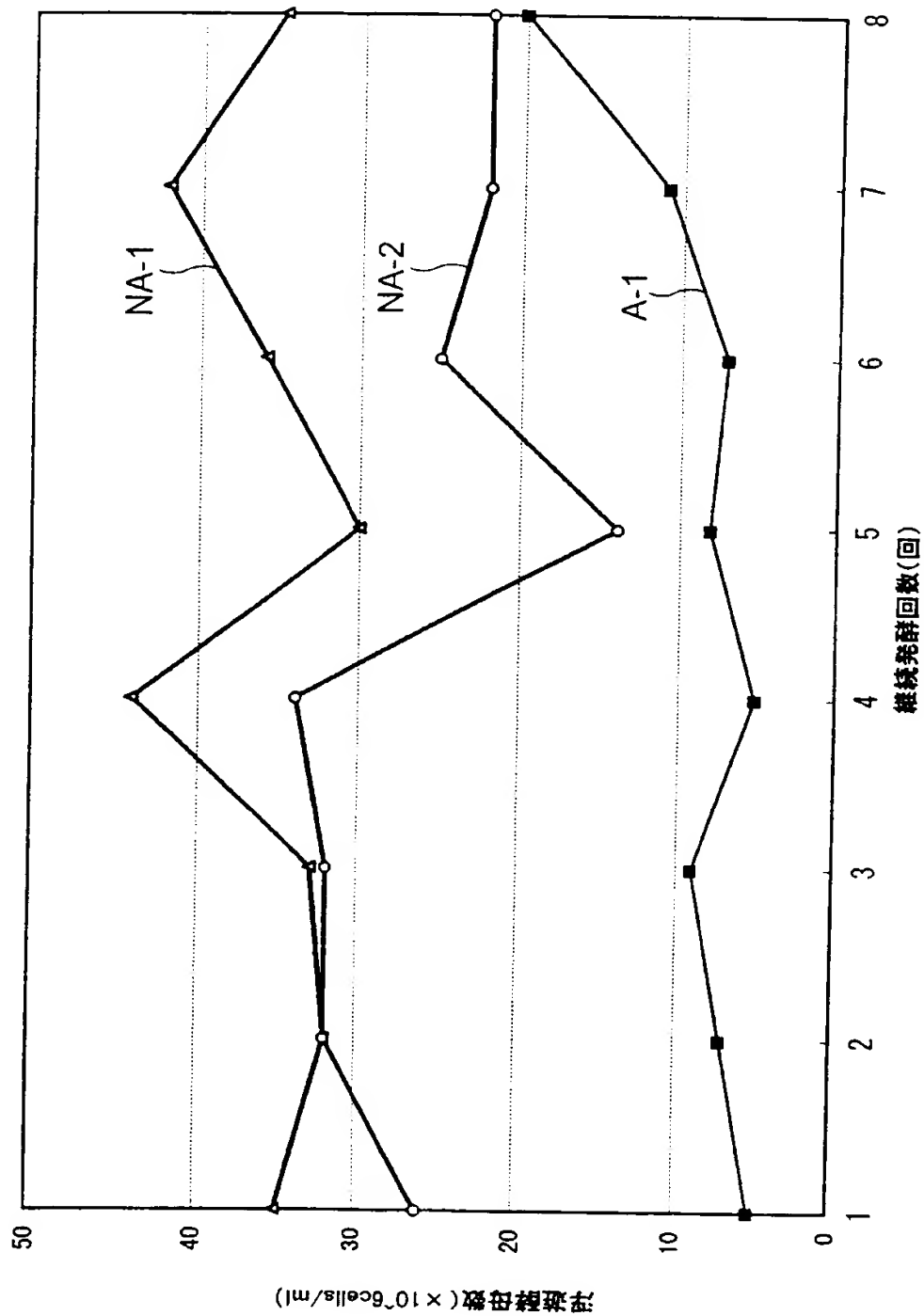


図3

発酵開始24時間のエキス消費量

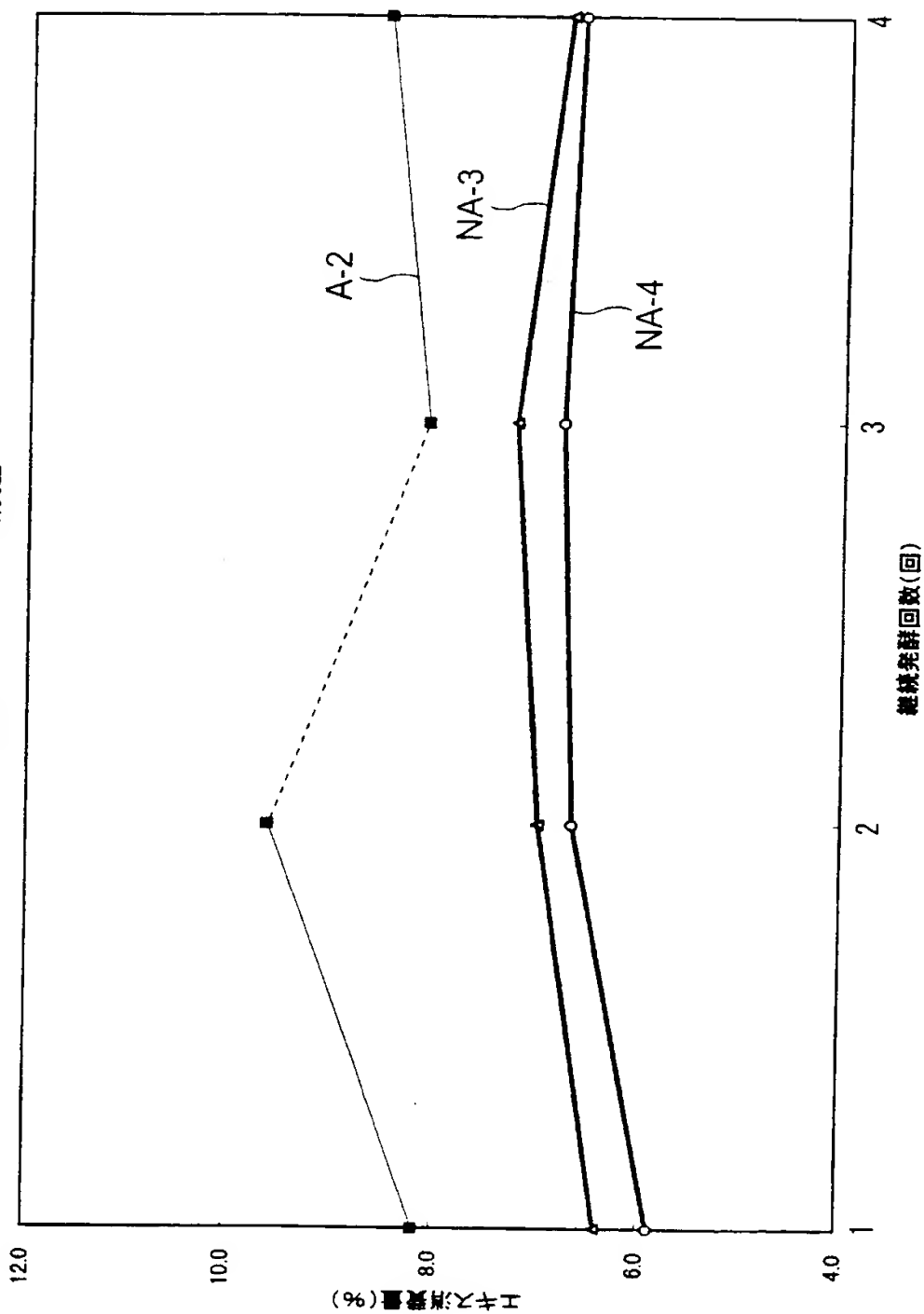


図4

主発酵終了時の浮遊酵母数

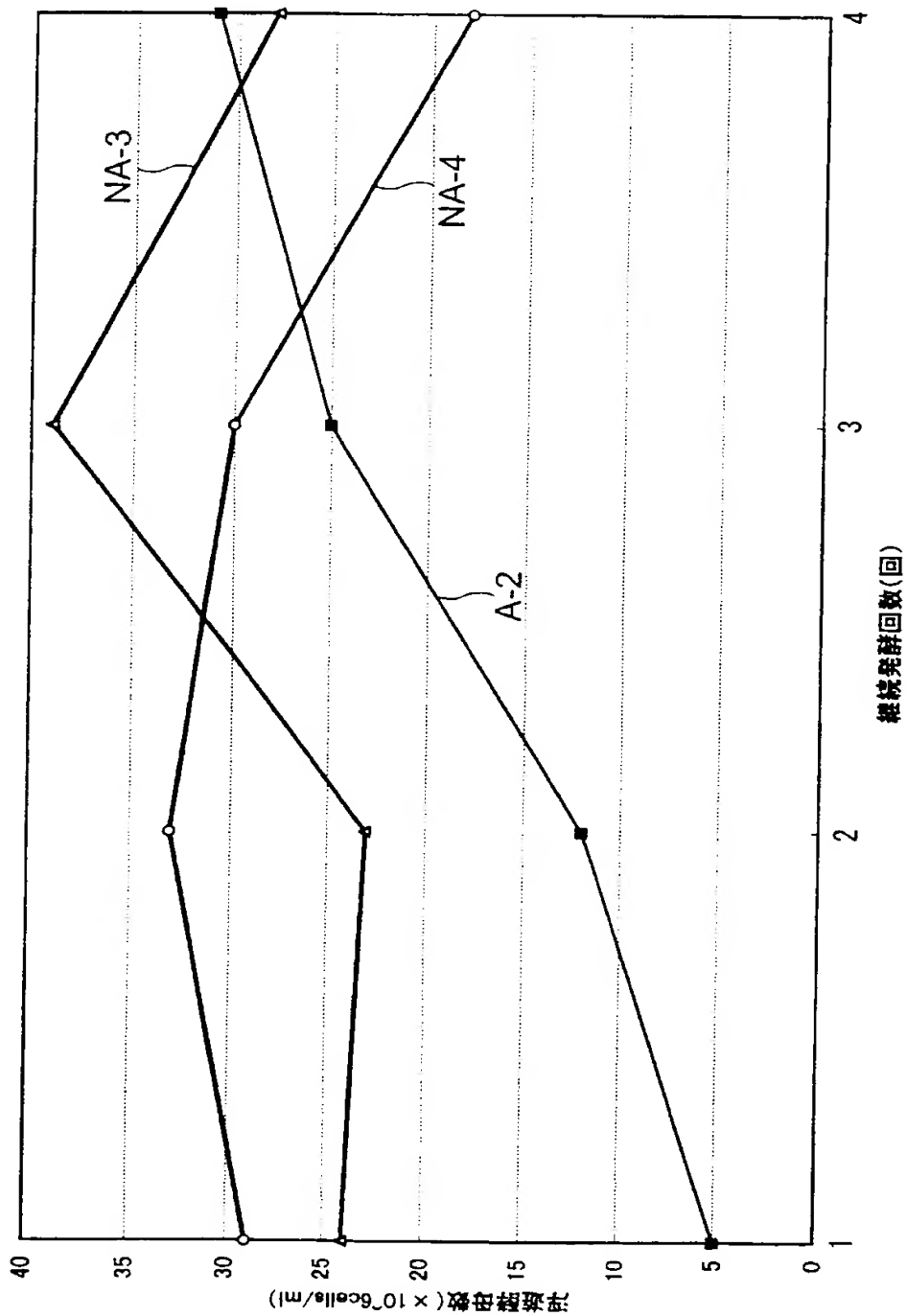


図5

主発酵終了時DA生成量

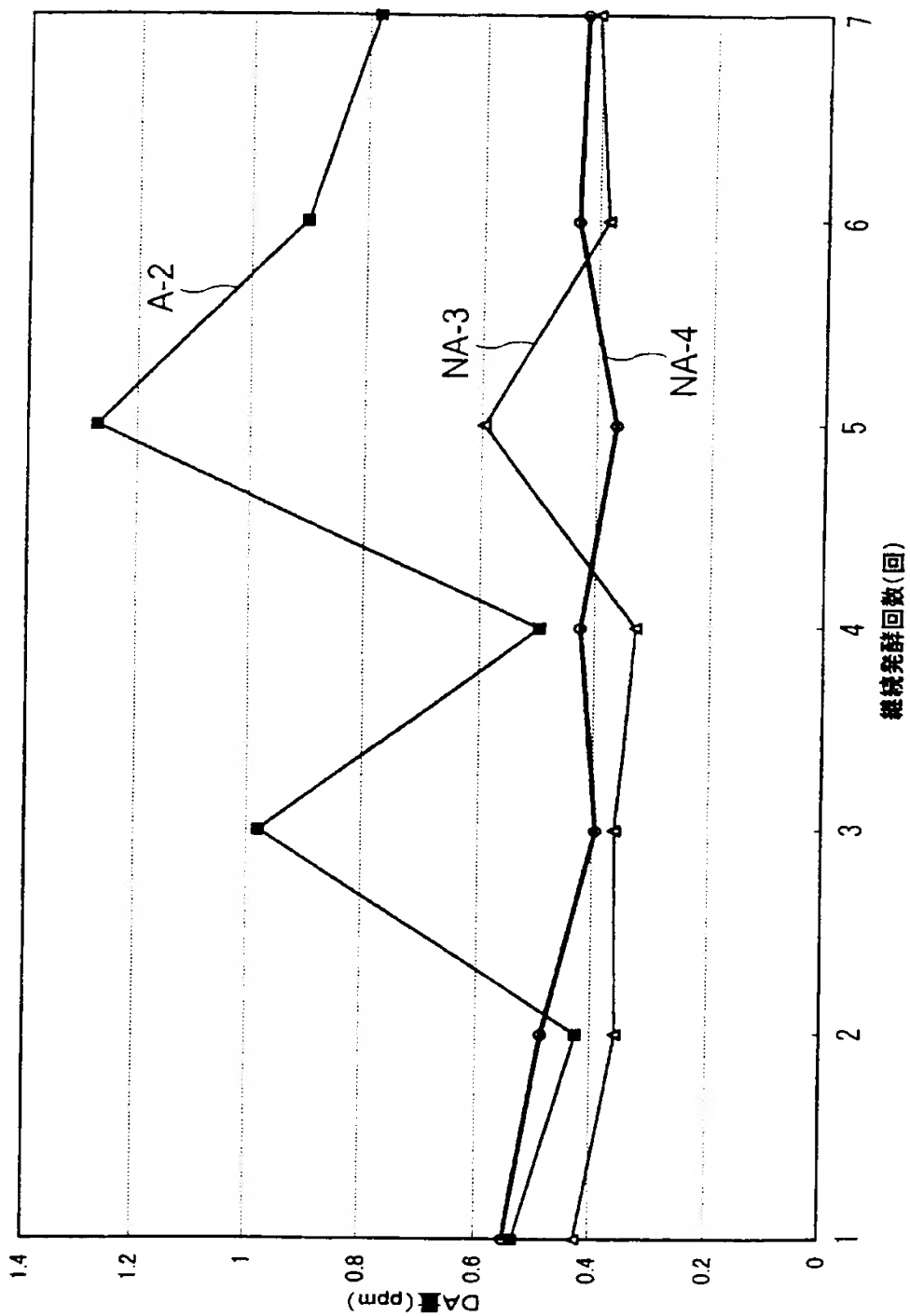


図6

発酵開始24時間のエキスを消費量

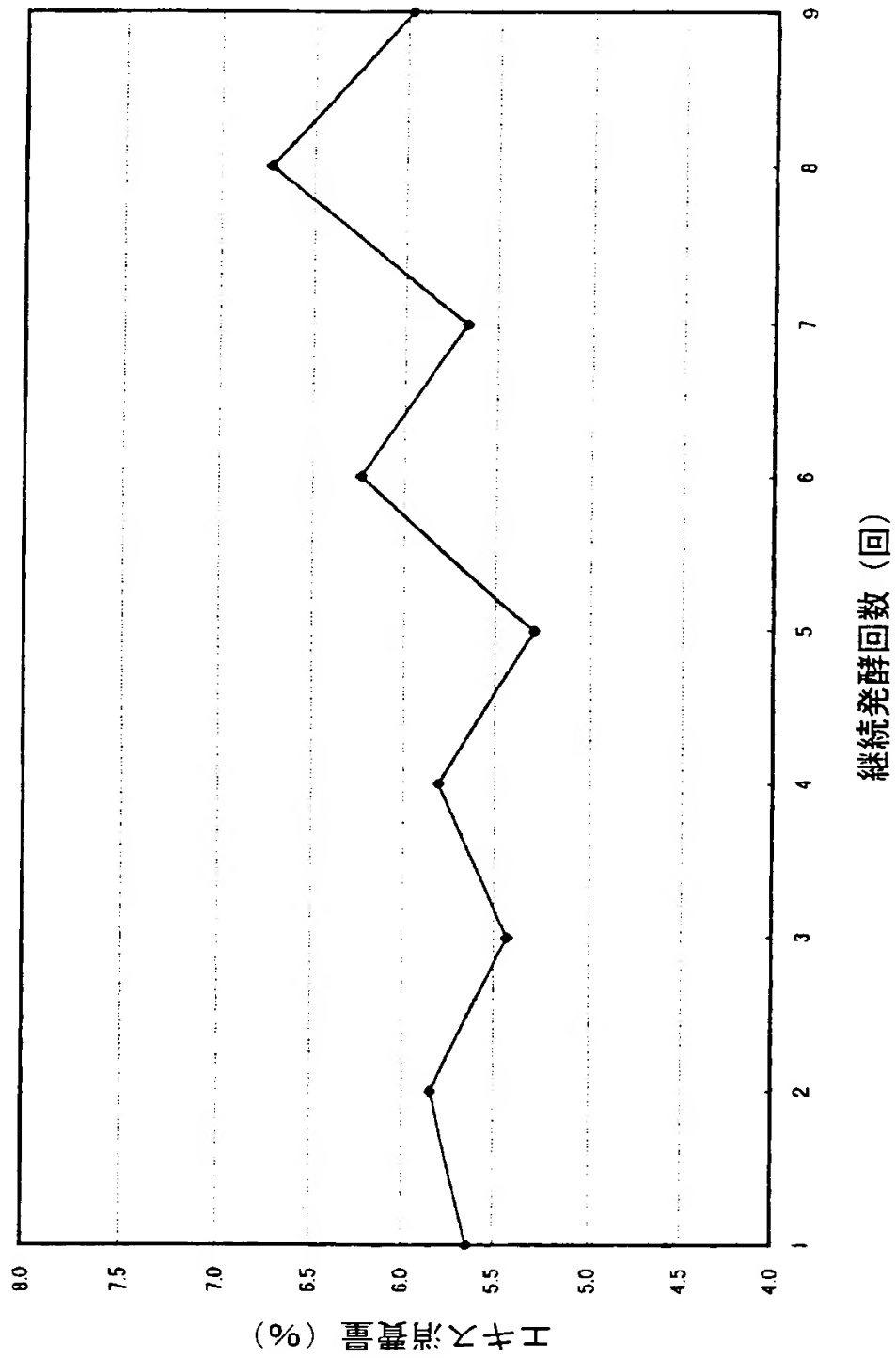




図7

主発酵終了時の浮遊酵母数

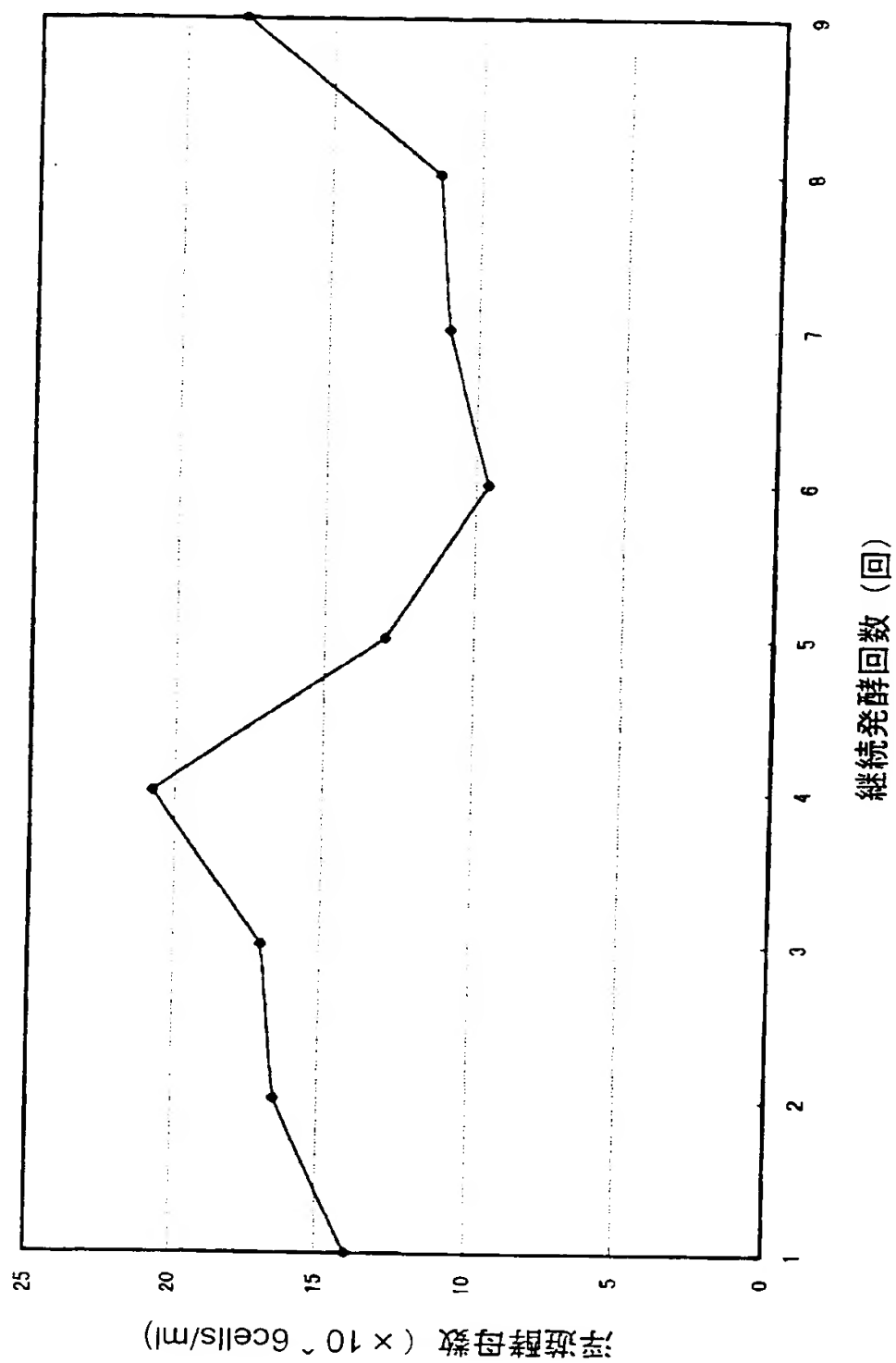
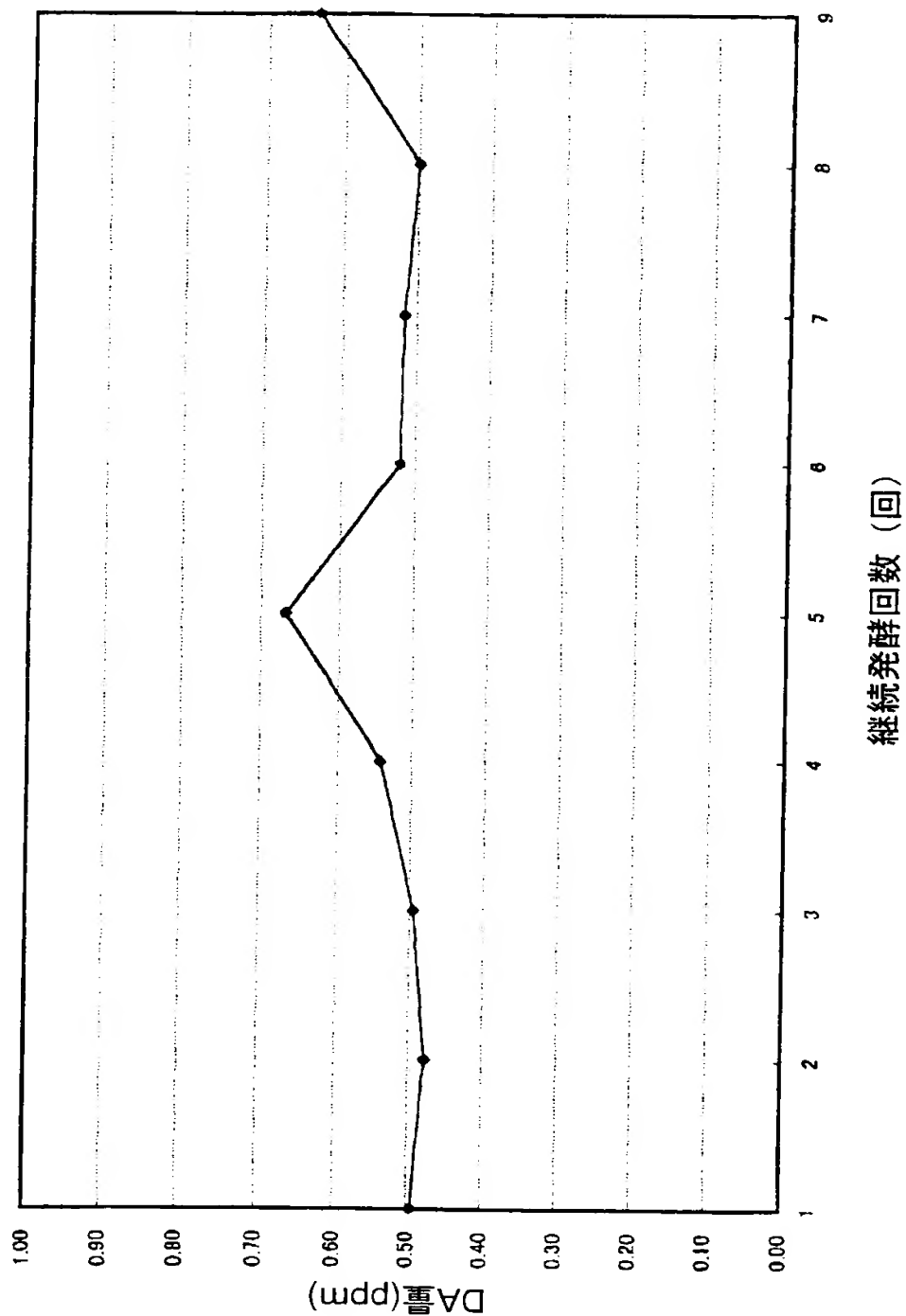


図8

主発酵終了時DA含有量



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei Patent and Law Firm
Okura-Honkan
6-12, Ginza 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0061
JAPON

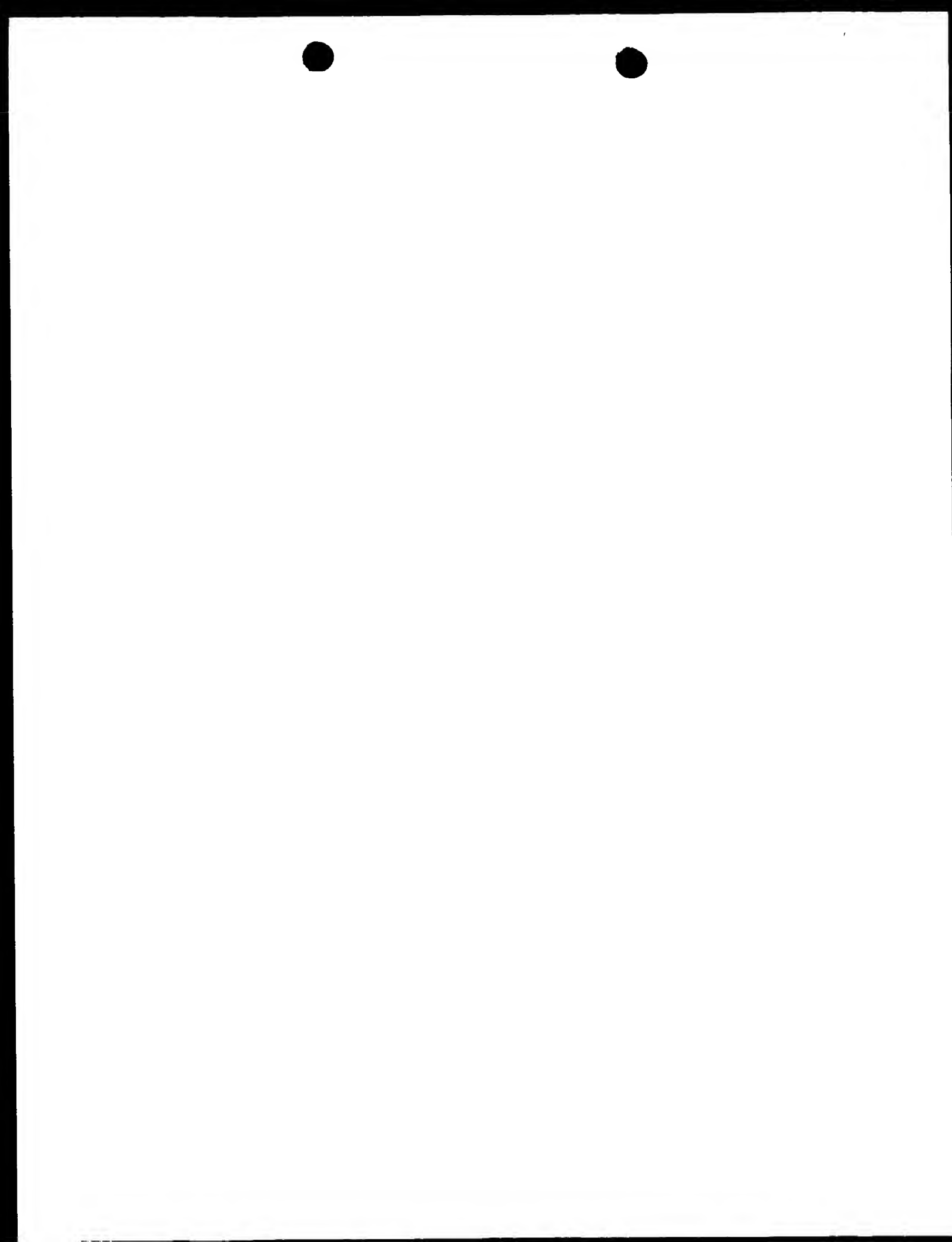
RECEIVED
'00.11.16
SOEI

Date of mailing (day/month/year) 07 November 2000 (07.11.00)	
Applicant's or agent's file reference FP00-0129-00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04355	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 30 June 1999 (30.06.99)
Applicant SAPPORO BREWERIES LIMITED et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
30 June 1999 (30.06.99)	11/186117	JP	18 Augu 2000 (18.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Somsak Thiphrakesone Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/02534
PCT/JP00/04355

PCT

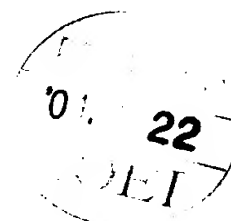
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei Patent and Law Firm
Okura-Honkan
6-12, Ginza 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0061
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 January 2001 (11.01.01)		
Applicant's or agent's file reference FP00-0129-00		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/04355	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)	Priority date (day/month/year) 30 June 1999 (30.06.99)
Applicant SAPPORO BREWERIES LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
- US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
- EP**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 11 January 2001 (11.01.01) under No. WO 01/02534

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 F P 0 0 - の書類記号 0 1 2 9 - 0 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 4 3 5 5	国際出願日 (日.月.年) 3 0 . 0 6 . 0 0	優先日 (日.月.年) 3 0 . 0 6 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) サッポロビール株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12C11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12C1/00-13/10, C12P7/06-7/14,
A23L1/238-1/238, 111

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST/JAFIC (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Process Biochemistry, 31(8), pp.737-744, 1996	1-2
Y	J.C.Ogbonna et al., "Development of a method for	3-5
A	immobilization of non-flocculating cells in Loofa (Luffa cylindrica) sponge"	6-8
X	JP, 7-184638, A (Takara Shuzo Co., Ltd.),	8
A	25 July, 1995 (25.07.95), Full text (Family: none)	1-7
Y	WO, 95-07343, A (SAPPORO BREWERIES),	3-5
A	16 March, 1995 (16.03.95), Full text & JP, 7-123969, A & EP, 669393, A1	1-2, 6-8
A	JP, 3-164188, A (Sanou Techno Institute K.K.), 16 July, 1991 (16.07.91), Full text (Family: none)	1-8
A	JP, 63-44880, A (Hitachi Zosen Corporation), 25 February, 1988 (25.02.88), Full text (Family: none)	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 September, 2000 (26.09.00)Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12C11/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12C1/00-13/10, C12P7/06-7/14,
A23L1/238

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST/JAFIC (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Process Biochemistry, 31(8), p. 737-744, 1996 J.C. Ogbonna et al., "Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in Loofa (Luffa cylindrica) sponge"	1-2 3-5 6-8
X A	JP, 7-184638, A (寶酒造株式会社) 25. 7月. 1995 (25. 07. 95) 全文 (ファミリーなし)	8 1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 09. 00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	WO, 95-07343, A (SAPPORO BREWERIES) 16. 3月. 1995 (16. 03. 95) 全文 & JP, 7-123969, A & EP, 669393, A1	3-5 1-2, 6-8
A	JP, 3-164188, A (三旺テクノインステイチュート株式会社) 16. 7月. 1991 (16. 07. 91) 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	JP, 63-44880, A (日立造船株式会社) 25. 2月. 1988 (25. 02. 88) 全文 (ファミリーなし)	1-8